

好熱菌由来Mn型スーパーオキシドディスムターゼの アミノ酸置換による変性剤耐性への影響

著者	渡辺 健太
学位名	博士（工学）
学位の種別	課程博士
報告番号	甲第360号
学位授与年月日	2014-03-24
URL	http://hdl.handle.net/10258/3450

氏名	わたなべ けんた 渡 辺 健 太
学 位 論 文 題 目	好熱菌由来 Mn 型スーパーオキシドディスムターゼのアミノ酸置換による変性剤耐性への影響
論 文 審 査 委 員	主 査 教 授 金 木 則 明 教 授 長谷川 靖 准教授 安 居 光 國

論文内容の要旨

生物は呼吸により酸素を体内に取り入れると、活性酸素が副産物として発生する。活性酸素には、スーパーオキシドアニオンラジカル、過酸化水素、ヒドロキシラジカルなどがあり、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) は、スーパーオキシドアニオンラジカルを酸素と過酸化水素に不均化させる。この SOD は活性中心に存在する金属の種類によって、Cu/Zn 型、Mn 型、Fe 型などがあり、Mn 型の SOD (MnSOD) は真核生物と原核生物の両方に存在している。また、好熱菌が生産する酵素は、熱や変性剤に対する耐性が高いと知られており、好熱菌から得られる MnSOD は工学的有用利用が期待できる抗酸化酵素である。

本研究では、2 種類の中度好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* (IFO12550 株) および *Bacillus stearothermophilus* (C36 株) の MnSOD について、ラウリル硫酸ナトリウム (SDS, sodium lauryl sulfate) に対する耐性を比較した。その結果、後者の耐性が高いことがわかった。これは、C36 株 MnSOD の 102 番目のアミノ酸がグルタミン酸であるのに対して IFO12550 株 MnSOD ではアスパラギン酸、187 番目ではそれぞれのアミノ酸はイソロイシン、バリンであり、いずれの置換も側鎖の炭素数を増加させ、C36 株 MnSOD ではタンパク質内部の疎水性の増大が、構造の安定性を引き起こしたものと考えられた。これを確かめるために、単一アミノ酸を置換した MnSOD を作製し、2 つのアミノ酸置換がそれぞれ耐性に関与していることが明らかになった。

また、活性部位付近のアミノ酸を置換することによって、C36 株 MnSOD の SDS 耐性ではなく、活性を向上させることにも取り組んだ。その結果、C36 株 MnSOD

の 164 番目のバリンをヒスチジンに置換することによって活性が向上した。これは、Mn 原子を保持しているアミノ酸に隣接した場所において、Mn 原子の保持に働くアミノ酸であるヒスチジンに置換したことにより、Mn 原子が活性部位に取り込まれやすくなったことが原因だと考えられた。

これらのことは、酵素の耐性向上や活性向上において指標を示し、今後の酵素の利用を広げるものである。

ABSTRACT

When the organism takes in oxygen by breathing into the body, the active oxygen arises as a by-product. Superoxide anion radical, hydrogen peroxide and hydroxyl radical are classified as the active oxygen. Superoxide dismutase (SOD) catalyzes the conversion of the superoxide anion radical to oxygen and hydrogen peroxide. SOD can be separated into three classes based on the metal cofactors (Cu/Zn type, Mn type and Fe type). There is MnSOD in eukaryote and prokaryotic. The enzyme which thermophilic bacteria produce is known that the tolerance of enzymatic activity for heat and the denaturant is high. Also, MnSOD from thermophilic bacteria is useful antioxidant enzyme for industry.

In this study, activity of MnSOD from thermophilic bacteria was measured after treatment of SDS (sodium lauryl sulfate). MnSOD of *Bacillus stearothermophilus* strain C36 was stable than that of *Bacillus stearothermophilus* strain IFO12550. There were only two differences of amino acid residues between strain C36 and strain IFO12550. Substitution position with Glu102Asp and Ile187Val were neither essential nor conserved. These inner amino acid residue changes suggested an approach to obtain more stable MnSOD.

Amino acids which form the active site are conserved. In this work, an amino acid of the active site neighborhood was substituted. As a result, activity improved by substituting 164Val for His in MnSOD. It was thought that Mn atom in an active site was caught by 163His and 164His. And this wobbling His residue increased Mn modulation.

論文審査結果の要旨

生物は呼吸により酸素を体内に取り入れると、活性酸素が副産物として発生する。スーパーオキシドディスムターゼ（SOD）は、活性酸素のスーパーオキシドアニオンラジカルを酸素と過酸化水素に不均化させる。この SOD は活性中心に Mn を持ち、SOD（MnSOD）は真核生物と原核生物の両方に存在している。また、好熱菌が生産する酵素は、熱や変性剤に対する耐性が高いと知られており、好熱菌から得られる MnSOD は工学的有用利用が期待できる抗酸化酵素である。

本研究では、2 種類の中度好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* (IFO12550 株) および *Bacillus stearothermophilus* (C36 株) の MnSOD について、ラウリル硫酸ナトリウム (SDS, sodium lauryl sulfate) に対する耐性を比較した。その結果、後者の耐性が高いことがわかった。これは、C36 株 MnSOD の 102 番目のアミノ酸がグルタミン酸であるのに対して IFO12550 株 MnSOD ではアスパラギン酸、187 番目ではそれぞれのアミノ酸はイソロイシン、バリンであり、いずれの置換も側鎖の炭素数を増加させ、C36 株 MnSOD ではタンパク質内部の疎水性の増大が、構造の安定性を引き起こしたものと考えられた。これを確かめるために、個々のアミノ酸を置換した MnSOD を作製し、2 つのアミノ酸置換がそれぞれ耐性に相乗的に関与していることが明らかにした。つまり、構造安定化は他のタンパク質の寄与を受けることなく、アミノ酸の疎水性の増加によって引き起こされるものを示した。

また、活性部位付近のアミノ酸を置換することによって、C36 株 MnSOD の SDS 耐性ではなく、活性を向上させることにも取り組んだ。その結果、C36 株 MnSOD の 164 番目のバリンをヒスチジンに置換することによって活性が向上した。これは、Mn 原子を保持しているアミノ酸に隣接した場所において、Mn 原子の保持に働くアミノ酸であるヒスチジンに置換したことが Mn への活性酸素のアプローチに効果を示したためだと考えられた。

これらのことは、酵素の耐性向上や活性向上において指標を示し、今後の酵素の利用を広げるものである。

以上の酵素の耐性の向上、活性の増大にいずれにおいても、わずか 1, 2 のアミノ酸が寄与することを実験的に証明したことは、プロテインエンジニアリングの有効な発展を生むものである。また、質疑応答も適切であり、内容の理解と伝達力も

認められた。よって、本学及び専攻が定める審査基準を満たしており、博士論文に値すると認めた。